

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24740294

研究課題名(和文)細胞骨格の制御機構の統一的理解：アクトミオシンがつくる動的秩序構造の双安定性

研究課題名(英文)Studies on the regulatory mechanism of actin cytoskeleton: bistabilities of the ordered structures of actomyosin mixture

研究代表者

宮崎 牧人(Miyazaki, Makito)

早稲田大学・理工学術院・次席研究員

研究者番号：40609236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：動物細胞には収縮環とストレスファイバーと呼ばれる2種類のアクトミオシンバンドルがあり、それぞれ細胞質分裂と細胞の形態維持に必須な細胞骨格である。これらの細胞骨格の形成機構を探るため、細胞から単離・精製したアクトミオシンと細胞サイズの油中液滴及びリポソームを用いて、細胞骨格様の構造が自己組織化される条件を探った。構造形成における双安定性を実験的に検証することは達成出来なかったが、細胞サイズの球状閉鎖空間ではアクトミオシンリングが、2次元平面上ではアクトミオシンバンドルの2次元ネットワークが自己組織化されて収縮する条件を見つけることができた。

研究成果の概要(英文)：Animal cells possess two types of actomyosin bundles called contractile rings and stress fibers, which are essential for cell division and cell shape maintenance, respectively. To investigate the assembly mechanisms of these cytoskeletal structures, we utilized purified actomyosin and cell-sized water-in-oil droplets or liposomes, and searched the biochemical and physical conditions at which the ordered structures resembling contractile rings and stress fibers were assembled. Although it was hard to verify the bistabilities of actomyosin systems, we found that contractile actomyosin rings were self-organized in a cell-sized spherically confined space, and contractile actomyosin bundle networks were self-organized when the motion of actin filaments was restricted in a two dimensional plane.

研究分野：生物物理学

キーワード：アクトミオシン 分子モーター 細胞骨格 自己組織化

1. 研究開始当初の背景

アクチン繊維はアクチンモノマーの重合によって形成される極性繊維で、片端では重合しつつ、もう片端では脱重合が進む動的な状態を保っている。一方で分子モーターのミオシンはアクチン繊維を架橋し、ATPの分解に伴う構造変化で張力を発生させる。さらにアクチンとミオシン(以下、まとめてアクトミオシンと呼ぶ)は熱揺らぎによって結合・解離を繰り返しているため、アクトミオシンのつくるバンドル構造は非常に動的な構造とわかる(図1)。

細胞には収縮環とストレスファイバーと呼ばれる2種類のアクトミオシンバンドルがある。細胞はこれら2種類の骨格を自在に形成・分解させることで細胞分裂と細胞の形態維持という生命活動に必須なことを実現しており、制御に関わる因子が次々に明らかになっている。しかし、動的なバンドル構造が自発的に形成・分解される仕組みは良くわかっていない。

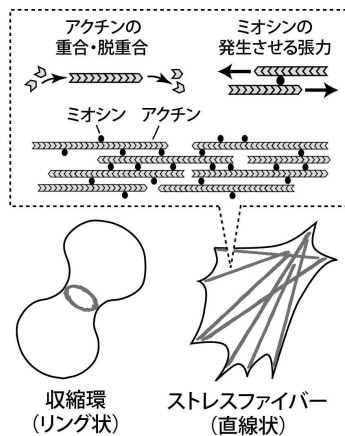


図1: アクトミオシンがつくる細胞骨格

2. 研究の目的

本研究では、細胞骨格を『極性繊維と分子モーターが自発的につくる動的な秩序構造』と捉えることで、細胞骨格の自発形成機構における共通原理を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

細胞生物学や分子生物学では形成と分解の制御因子と、形成・分解のシグナルの伝達経路を決定することが中心的課題であるが、完全にわかったとしても自発的にバンドルが形成・消滅する仕組みは分からないだろう。そこで本研究では、アクチン細胞骨格の形成・分解の制御は分岐現象で理解できるのではという仮説のもと、細胞から単離・精製したアクトミオシンと細胞サイズの油中液滴などを用いることで、様々な制御因子の影響を排除し、アクトミオシンの活性や境界条件がアクトミオシンのつくる動的秩序構造にどのような影響を与えるかを調査する。構成論的手法によって収縮環とストレスファ

イバー様の構造が自己組織化される条件を探ることで、収縮環とストレスファイバーの形成・分解の制御機構という生物学では全く別個に扱われていた事象を統一的に理解することを旨とする。

4. 研究成果

(1) アクチン繊維の極性を揃える技術の確立

ストレスファイバーの両端のアクチン繊維は、プラス端が外側を向くように極性が揃った状態で細胞接着班に固定されていることが知られている。ストレスファイバーの自発形成において、両端のアクチン繊維の極性(境界条件)がどのくらい重要なかを調べるためには、アクチン繊維の極性を制御できる技術が必要と考えた。そこで、アクチン繊維のプラス端に特異的に結合するゲルソリン(カルシウムによる結合能の制御をなくすために遺伝子改変を行った変異体)を用いて、アクチン繊維の極性を揃える基盤技術を確立した。ゲルソリンを介してアクチン繊維をスライドガラスにアンカーし、溶液の流れでアクチン繊維を配向させ、アクチン繊維上のミオシンの運動方向で極性を調べた。その結果、99%以上の高効率でアクチン繊維の極性を制御できていることがわかった[論文4]。

(2) アクトミオシンを内包した細胞サイズ液滴及びリポソームの作製法の確立と、リポソームの膜の多重性(ラメラリティー)の定量的評価

収縮環形成における細胞の形状や大きさの物理的寄与を調べるためには、細胞サイズの微小閉鎖空間にアクトミオシン溶液を封入する技術が必要であった。そこで、リン脂質を溶かしたミネラルオイルとアクトミオシン水溶液を混ぜ合わせて乳化させることで、細胞サイズの油中液滴を作製する技術を確立した[論文2]。さらに油水界面に油中液滴を通過させてリポソームを作製する界面通過法と呼ばれる手法を習得した。界面通過法は高濃度のタンパク質を生理的条件下でリポソームに封入出来る画期的手法であるが、この手法で作製したリポソームの膜のラメラリティー(多重性)は定量的に調べられていなかった。そこで我々は界面通過法で作製したリポソームのラメラリティーを定量化する手法を開発し(図2)、内包物や膜組

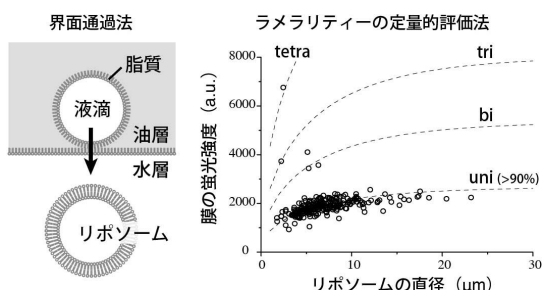


図2: 界面通過法で作製したリポソームのラメラリティー測定

成に依らず 90%以上のリポソームが1重の脂質二重膜から成ることを明らかにした。従って、界面通過法はモデル細胞の作製に最適な手法とわかった[論文 3]。

(3)細胞サイズ液滴内でのアクトミオシンリングの自発形成と収縮

動物細胞の多くは有糸分裂期になると細胞の形を丸く変化させ、赤道面に収縮環と呼ばれるリング状のアクトミオシンバンドルを形成する。収縮環形成のメカニズムとして広く受け入れられている仮説は、赤道面近傍のみでアクトミオシンが活性化されることでリングが形成されるという考え方である。一方で、細胞のような微小閉鎖空間ではアクチン繊維の振る舞いはバルクと異なることが近年になって色々と報告されており、収縮環形成においても細胞という微小反応場の物理的寄与が考えられる。

そこで、収縮環形成における微小閉鎖空間の物理的効果を明らかにするために、細胞から単離したアクトミオシンを様々な大きさの球状閉鎖空間(油中液滴)に閉じ込めた人工細胞系で、収縮環様のリングが自発的に形成される条件を調査した。その結果、アクチンモノマー、ミオシンとアクチン繊維の束化因子(メチルセルロース or アクチニン)を液滴に封入してアクチンを重合させると、「液滴サイズ<アクチン繊維の持続長」の条件を満たす場合はリングが自発的に形成されることを発見した(図3)。アクトミオシン活性の空間制御シグナルが無いにも関わらず、リングは必ず赤道面に形成され、ミオシン濃度に依存してアクチンリングの形成確率が上がった。タイムラプス顕微鏡観察により、ミオシンがアクチンネットワークをリモデリングすることでリング形成が促進されていることが分かった。さらに、アクチン繊維に結合しているミオシン分子の密度の上昇によりリングが収縮することを発見。液滴内で自発形成したアクトミオシンリングは、収縮速度が収縮直前のリングの周長に比例するという収縮環の基本的性質を満たしていた。本研究によって、収縮環形成と収縮の制御には細胞の形態が丸くなることと、アクトミオシンの段階的活性化が重要であることが示唆された[論文 1]。

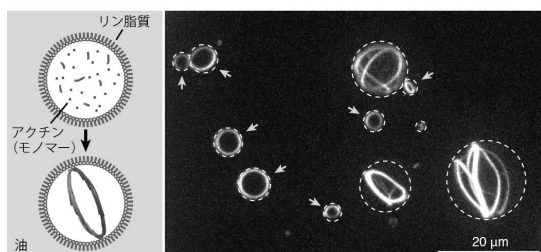


図3：細胞サイズ油中液滴内で自己組織化したアクチンリング

(4) 2次元平面上でのアクチンバンドルの自発形成と収縮

まず、アクチン繊維と PEG を混ぜた溶液をフローセルに流し込み、PEG による depletion 効果を利用してアクチン繊維の動きをガラス上に制限させることで、アクチン繊維を2次元平面上に密に局在させた。そこにアクチン繊維の束化タンパク質であるアクチニンを添加すると、アクチンバンドルの2次元ネットワークが自発的に形成されることを発見(図4)。ネットワークの最終形状は、バンドル化因子の最終濃度ではなく、濃度の変化速度が決められていることを示唆するデータが得られた。このアクチンバンドルの2次元ネットワークに双頭ミオシン(HMM)と ATP を添加したところ、バンドルが収縮し、収縮後のネットワークの形状が HMM の濃度に依存することを見つけた(論文準備中)。

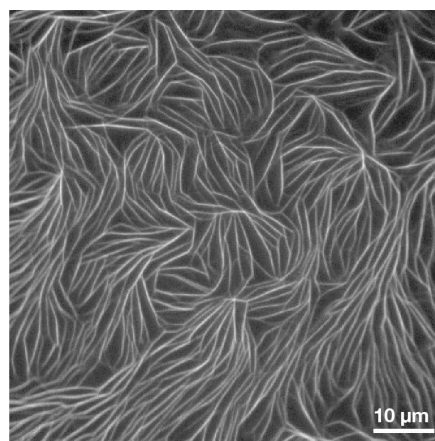


図4：自己組織化したアクチンバンドルの2次元ネットワーク

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

1) Makito Miyazaki, Masataka Chiba, Hiroki Eguchi, Takashi Ohki, Shin'ichi Ishiwata, Cell-sized spherical confinement induces the spontaneous formation of contractile actomyosin rings in vitro, *Nature Cell Biology*, **17**, 480-489 (2015) doi:10.1038/ncb3142 [査読有]

2) Makito Miyazaki, Masataka Chiba, Shin'ichi Ishiwata, Preparation of cell-sized water-in-oil droplets for in vitro reconstitution of biological processes in cellular compartments, *Protocol Exchange* (2015) doi:10.1038/protex.2015.029 [査読無]

3) Masataka Chiba, Makito Miyazaki, Shin'ichi Ishiwata, Quantitative analysis of the lamellarity of giant liposomes prepared by the inverted emulsion method, *Biophysical Journal*, **107**, 346-354 (2014) doi:10.1016/j.bpj.2014.05.039 [査読有]

4) Makito Miyazaki, Kazuhiko Kinoshita Jr., Katsuyuki Shiroguchi, Accurate polarity control and parallel alignment of actin filaments for myosin-powered transport systems, *RSC Advances*, **3**, 8728-8733 (2013) doi:10.1039/C3RA41112E [査読有]

〔学会発表〕(計13件)

1) 宮崎牧人、構成論的アプローチによるアクチン細胞骨格の形成機構の解明、理研セミナー、2015.3.24、東京大学 [招待講演]

2) Makito Miyazaki, Masataka Chiba, Hiroki Eguchi, Takashi Ohki, Shin'ichi Ishiwata, In vitro self-assembly and contraction of actomyosin rings inside a cell-sized droplet, The 52nd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2014.9.25-27, Sapporo, Japan

3) Hiroki Eguchi, Makito Miyazaki, Takashi Ohki, Shin'ichi Ishiwata, Myosin-dependent morphological changes of two-dimensional actin networks crosslinked by α -actinin, The 52nd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2014.9.25-27, Sapporo, Japan

4) Kazuya Suzuki, Makito Miyazaki, Jun Takagi, Takeshi Itabashi, Shin'ichi Ishiwata, Cytoplasmic rotational flow induced by symmetry breaking of active microtubule networks, The 52nd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2014.9.25-27, Sapporo, Japan

5) Makito Miyazaki, Masataka Chiba, Takashi Ohki, Shin'ichi Ishiwata, In vitro self-assembly of contractile actomyosin rings in cell-sized confined spaces, Workshop on Mechanics and Growth of Tissues: From Development to Cancer, 2014.1.13-16, Curie Institute, Paris, France

6) Masataka Chiba, Makito Miyazaki, Shin'ichi Ishiwata, Quantitative analysis of the lamellarity of giant liposomes prepared by inverted emulsion method, Workshop on Mechanics and Growth of Tissues: From Development to Cancer, 2014.1.13-16, Curie Institute, Paris, France

7) Kazuya Suzuki, Makito Miyazaki, Jun Takagi, Takeshi Itabashi, Shin'ichi Ishiwata, Observation of directional flow induced by active microtubule networks, Workshop on Mechanics and Growth of Tissues: From Development to Cancer, 2014.1.13-16, Curie Institute, Paris, France

8) 宮崎牧人、千葉雅隆、大木高志、石渡信一、細胞サイズ液滴内でのアクトミオシンリングの自発形成と収縮、生体運動合同班会議、

2014.1.10-12、千葉大学

9) 久保田寛顕、宮崎牧人、小川泰策、木下一彦、Forminの動きを顕微解析しアクチンのステップ状重合を捉える、生体運動合同班会議、2014.1.10-12、千葉大学

10) Makito Miyazaki, Masataka Chiba, Hiroki Eguchi, Shin'ichi Ishiwata, Self-organized pattern formation by actomyosin mixtures in a cell-size confined space, The 51st Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2013.10.28-30, Kyoto, Japan [招待公演]

11) Hiroki Eguchi, Makito Miyazaki, Masataka Chiba, Takashi Ohki, Shin'ichi Ishiwata, Two-dimensional network pattern of actin filaments: Structure and dynamics, The 51st Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2013.10.28-30, Kyoto, Japan

12) Masataka Chiba, Makito Miyazaki, Shin'ichi Ishiwata, Measuring the lamellarity of giant liposomes prepared by inverted emulsion method, The 51st Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2013.10.28-30, Kyoto, Japan

13) Masataka Chiba, Makito Miyazaki, Takashi Ohki, Shin'ichi Ishiwata, Filopodia-like protrusions in water-in-oil droplets induced by Arp2/3 and actin polymerization, The 50th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2012.9.22-24, Nagoya, Japan

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ishiwata.phys.waseda.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 牧人 (MIYAZAKI, Makito)

早稲田大学・理工学術院・次席研究員

研究者番号：40609236